

① BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

26
Off n l gungsschrift
DE 197 04 979 A 1

⑤ Int. Cl. 6:
C 12 N 15/79
A 61 K 48/00

② Aktenzeichen: 197 04 979.6
③ Anmeldetag: 29. 1. 97
④ Offenlegungstag: 14. 8. 97

DE 197 04 979 A 1

⑥ Innere Priorität:
196 04 378.6 07.02.96

⑦ Anmelder:
Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin,
13125 Berlin, DE

⑧ Erfinder:
Bargou, Ralf, Dr., 13353 Berlin, DE; Baum,
Christopher, Dr., 22589 Hamburg, DE; Hönemann,
Dirk, 13347 Berlin, DE

⑤ Retroviraler Vektor für den Gentransfer eines IL6-Antagonisten in humane hämatopoetische Stammzellen

⑦ Die Erfindung betrifft einen retroviralen Vektor für den Gentransfer eines Interleukin-6(IL6)-Antagonisten in humane hämatopoetische Stammzellen zur Behandlung des multiplen Myeloms. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie. Der erfindungsgemäße Vektor besteht aus

- einem retroviralen Ausgangsvektor,
- dem Gen eines IL6-Antagonisten,
- einem Suizid- bzw. Selektionsgen
- und ggf. Promotoren zur Transkription der Suizid- bzw. Selektionsgene.

Eine bevorzugte Ausführungsform besteht aus dem MoMLV-Derivat pLXSN als retroviralen Ausgangsvektor, dem Gen eines an bis zu 20 Kodons im Vergleich zum humanen Interleukin-6 mutierten IL6-Antagonisten, dem Gen für die Neomycin-Acetyltransferase als Selektionsgen und den viralen immediate-early-Promotoren der CMV und SV40 Viren. Eine weitere bevorzugte Ausführungsform besteht aus dem MoMLV-Derivat pSF1N als retroviralen Ausgangsvektor, dem Gen eines an 7 Kodons im Vergleich zum humanen Interleukin-6 mutierten IL6-Antagonisten und dem Thymidin-kinas gen oder d m Cytosin-D saminas gen als Suizidgen bzw. dem Puromycingen oder d m mdr-1-Gen als Selektionsgen.

DE 197 04 979 A 1

Die folgend n Angaben sind den v m Anmelder eingereichten Unterlag n entnomm n

Beschreibung

Die Erfindung betrifft einen retroviralen Vektor für den Gentransfer eines IL6-Antagonisten in humane hämatopoetische Stammzellen zur Behandlung des multiplen Myeloms. Anwendungsg biete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

Das multiple Myelom, oder auch Plasmazytom, ist eine unheilbare maligne Erkrankung der Antikörper-sezierenden B-Zelle mit einer jährlichen Inzidenz von 4 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner in Deutschland. Hauptlokalisation der Plasmazytomzellen sind Knochen und Knochenmark, wo sie zu Osteolysen bzw. Verdrängung der Hämatopoese, mit den Folgen Anämie, Leukozytopenie und Thrombozytopenie führen. Trotz der Einführung unterschiedlicher Polychemotherapieprotokolle und der Strahlentherapie besteht für das multiple Myelom nach wie vor kein kurativer Ansatz. Die mittlere Überlebenszeit nach Erkrankungsbeginn beträgt 3 Jahre (W. Siegenthaler et al, Lehrbuch der inneren Medizin, 3. Auflage (1992), S. 723–727).

In den letzten Jahren konnte mit Interleukin-6 (IL6) ein Zytokin charakterisiert werden, das für das Wachstum von Plasmazytomzellen von entscheidender Bedeutung ist. So konnte vor kurzem gezeigt werden, daß es nicht möglich ist, bei transgenen IL6 "knock-out" Mäusen, also Mäusen, die kein funktionelles IL6 Gen mehr besitzen, Plasmazytome zu induzieren oder bereits etablierte (syngene) Plasmazytomzellen zu propagieren, während dies bei nicht-"knock-out" Mäusen ohne weiteres möglich war. (Hilbert, D.M., M. Kopf, B.A. Mock, G. Köhler, and S. and Rudikoff. 1995. Interleukin-6 is essential for in vivo development of B neoplasms. J. Exp. Med.: 182: 243–248). Erste klinische Einsätze von IL-6-neutralisierenden Antikörpern führten zu vorübergehenden partiellen Remissionen (Klein, B., Wijdenes, J., Zhang, X.G., Jourdan, M., Boiron, J.M., Brochier, J., Liautard, J., Merlin, M., Clement, C., Morel-Fournier, B. et al 1991. Murine anti-interleukin-6 antibody therapy for a patient with plasma cell leukemia. Blood. 78: 1198–1204.3). Allerdings ist aufgrund der hohen lokalen IL6-Konzentration im Knochenmark nicht zu erwarten, daß die systemische Gabe von Antikörpern zu einer ausreichenden Antagonisierung führt, so daß klinische Versuche in dieser Richtung keinen Erfolg versprechen.

Die Erfindung hat das Ziel, eine gentherapeutische Strategie zur Bekämpfung des multiplen Myeloms mit Hilfe von IL6-Antagonisten zu entwickeln. Mit dieser Strategie soll erreicht werden, daß die biologisch wirksame Konzentration dieses Antagonisten im Knochenmark bei einer klinischen Anwendung ausreichend hoch ist, um das vorhandene IL6 zu neutralisieren.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, einen Vektor zu konstruieren, der nach Transfer in autologe hämatopoetische Stammzellen einen geeigneten IL6-Antagonisten stark und stabil zur Expression bringt.

Die Erfindung wird gemäß Anspruch 1 realisiert, die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten.

Wesentliche Basis der Erfindung ist ein retroviraler Ausgangsvektor, bevorzugt ein MoMLV-Derivat, besonders bevorzugt der Vektor pSF1N, der für den Gentransfer in hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen eine besonders hohe Expressionsstärke zeigt. In diesen Vektor wird mit in der Gentechnik an sich bekannten Methoden das Gen eines IL6-Antagonisten und ein Suizid- bzw. ein Selektionsgen eingebaut. Als Suizidgen sind vor allem das Thymidinkinasegen und das Cytosin-Desaminasegen geeignet. Als Selektionsgen werden bevorzugt das Puromycin-, das Neomycin-Acetyltransferasegen oder das *mdr-1*-Gen eingesetzt.

Das Gen des IL6-Antagonisten und das Suizid- bzw. Selektionsgen liegen bevorzugt auf derselben mRNA, werden also von demselben für Stammzellen besonders geeigneten Promotor in der Expression gesteuert, und werden dennoch getrennt translatiert. Somit könnten im Falle des Suizidgens bei unvorhergesehenen Nebenwirkungen des therapeutischen Gens, z. B. auf die normale Hämatopoese des Patienten, gezielt diejenigen Zellen abgetötet werden, die den IL6-Antagonisten produzieren. Im Falle des *mdr-1*-Gens werden Stammzellen, die unter dem Selektionsdruck einer Chemotherapie hohe Mengen an *mdr-1* produzieren, auch gleichzeitig große Mengen IL6-Antagonist exprimieren.

Von besonderer Bedeutung für die Wirkung des Vektors ist die Auswahl des IL6-Antagonisten. Grundsätzlich können alle bekannten IL6-Antagonisten eingesetzt werden, bevorzugt sind jedoch an bis zu 20 Kodons gegenüber dem humanen Interleukin-6 mutierten Antagonisten.

Eine wichtige Ausführungsform des Vektors ist die Einfügung des Gens des an 7 Kodons mutierten IL6-Antagonisten folgender Sequenz (Mutationen sind durch kleine Buchstaben gekennzeichnet):

1 CCAGGA~~ACC~~ AGCTATGAAC TCCTTCTCCA ~~AGCGCCTT~~ CGGTCCAGTT
 51 GCCTTCTCCC TGGGGCTGCT CCTGGTGTG CCTGCTGCCT TCCCTGCCCC
 101 AGTACCCCCA GGAGAAGATT CCAAAGATGT AGCCGCCCCA CACAGACAGC
 151 CACTCACCTC TTCAGAACGA ATTGACAAAC AAATT~~CGG~~gA CATCCTCGAC
 201 ~~CT~~CATCTCAG CCCTGAGAAA GGAGACATGT AACAAGAGTA ACATGTGTGA
 251 AAGCAGCAAA GAGGCACTGG CAGAAAACAA CCTGAACCTT CCAAAGATGG
 301 CTGAAAAAGA TGGATGCTTC CAATCTGGAT TCAATGAGGA GACTTGCCTG
 351 GTGAAAATCA TCACTGGTCT TTTGGAGTTT GAGGTATACC TAGAGTACCT
 401 CCAGAACAGA TTTGAGAGTA GTGAGGAACA AGCCAGAGCT GTGCAGATGA
 451 ~~G~~aACAAAGa CCTGATCCAG TTCCTGCAGA AAAAGGCAAA GAATCTAGAT
 501 GCAATAACCA CCCCTGACCC AACCACAAAT GCCAGCCTGC TGACGAAGCT
 551 GCAGGCACAG AACCAGTGGC TGCAGGACAT GACAACTCAT CTCATTCTGC
 601 GCAGCTTTAA GGAGTTCCTG ~~atccg~~CAGCC TGAGGGCTCT TCGG~~g~~cAATG
 651 TAGCAT~~c~~Gat ACC

(Gen 1^{''})

Eine weitere wichtige Ausführungsform ist ein an 12 Kodons Mutationen enthaltender IL6-Antagonist (zusätzlich myc-Tag) folgender Sequenz (Mutationen sind durch kleine Buchstaben gekennzeichnet):

1 CCAGGA_tCCC AGCTATGAAC TCCTTCTCCA CAAGCGCCTT
 CGGTCCAGTT
 5 51 GCCTTCTCCC TGGGGCTGCT CCTGGTGTTG CCTGCTGCCT
 TCCCTGCCCC.
 10 101 AGTACCCCCA GGAGAAGATT CCAAAGATGT AGCCGCCCCA
 CACAGACAGC
 15 151 CACTCACCTC TTCAGAACGA ATTGACAAAC AAATTCGGgA
 CATCCTCGAC
 20 201 ttCATCTCAG CCCTGAGAAA GGAGACATGT AACAAGAGTA
 ACATGTGTGA
 25 251 AAGCAGCAA GAGGCACTGG CAGAAAACAA CCTGAACCTT
 CCAAAGATGG
 30 301 CTGAAAAAGA TGGATGCTTC CAATCTGGAT TCAATGAGGA
 GACTTGCCTG
 35 351 GTGAAAATCA TCACTGGTCT TTTGGAGTTT GAGGTATACC
 TAGAGTACCT
 40 401 CCAGAACAGA TTTGAGAGTA GTGAGGAACA AGCCAGAGCT
 GTGCAGATGA
 45 451 GaACAAAAGa CCTGATCCAG TTCCTGCAGA AAAAGGCAAA
 GAATCTAGAT
 50 501 GCAATAACCA CCCCTGACCC AACCACAAAT GCCAGCCTGC
 TGACGAAGCT
 55 551 GCAGGCACAG AACCAGTGGC TGCAGGACAT GACAAC_tTCAT
 CTCATTCTGC
 60 601 GCAGCTTTAA GGAGTTCCTG atccgCAGCC TGAGGGCTCT
 TCGGg_cAATG
 65 651 gaacagaaac tgatctccga agaagatctg taatagatcg atacc

(SANT 7 =_n Gen 2^k)

Eine bevorzugte Kombination der Merkmale des Vektors ist die Verwendung

- des retroviralen Ausgangsvektors pSF1N,
- des Gens des an 7 Kodons gegenüber dem humanen Interleukin-6 mutierten IL6-Antagonisten der Sequenz "Gen 1"
- und eines Suizid- bzw. Selektionsgens.

Eine weitere wichtige Kombination ist ein Vektor

- pLXSN als retroviralem Ausgangsvektor,
- dem "Gen 2" als IL6-Antagonisten,
- dem Gen für Neomycin-Acetyltransferase als Selektionsgen und
- dem Simian Virus 40 early Promotor (SV40) als internem Promotor zur Transkription des Selektionsgens im Ausgangsvektor.

Der Aufbau der erfindungsgemäßen Vektoren ist in den Abb. 1 und 2 schematisch dargestellt.

Die Verpackung des Vektors erfolgt mit Hilfe bekannter viraler Vektor-Verpackungslinien, welche nichtreplikationsfähige Retroviren generieren können. Die Auswahl der verwendeten Virushülle hat erhebliche Auswirkungen auf die Effizienz des Gentransfers. Besonders geeignet sind die Linien FLY13 und GP+envAm12.

Die Anwendung des Vektors erfolgt in der Weise, daß hämatopoetische Stammzellen aus peripherem Blut bzw. Knochenmark von Patienten durch Zytokin stimuliert werden, der Transfer des Vektors in diese Stammzellen erfolgt und sie anschließend, bevorzugt durch intravenöse Injektion, wieder in den Patienten zurückgegeben werden. Da hämatopoetische Stammzellen nach systemischer Gabe bevorzugt im Knochenmark 'homen', ist die Expression des IL6-Antagonisten in diesem Organ gesichert.

Der erfindungsgemäße Vektor hat eine hohe Genexpressionsrate in hämatopoetischen Stammzellen und ist dadurch effektiv einsetzbar. Er ermöglicht einen kurativen Ansatz zur Behandlung des multiplen Myeloms, der bisherigen Therapieverfahren potentiell überlegen ist.

Die Erfindung soll nachfolgend durch Anwendungsbeispiele näher erläutert werden.

5

Beispiel I

- 1) Die cDNA des in der Literatur beschriebenen humanen IL6-Antagonisten wurde mittels RT-PCR hergestellt. Es wurden dabei auf Grundlage der humanen Interleukin-6 Sequenz Punktmutationen eingeführt, die zu folgenden sieben Aminosäuren-Austauschen führen: Pos 31 (Aspartat für Tyrosin), Pos 35 (Phenylalanin für Glycin), Pos 118 (Arginin für Serin), Pos 121 (Aspartat für Valin), Pos 175 (Isoleucin für Glutamin), Pos 176 (Arginin für Serin), Pos 183 (Alanin für Glutamin) Lit.: Savino, R., Ciapponi, L., Lahm, A., Dematis, A., Cabibbo, A., Toniatti, C., Delmastro, P., Altamura, S., and Ciliberto, G. 1994. Rational design of a receptor super-antagonist of human IL-6. EMBO.J. 13: 5863—5870.
- 2) Die cDNA des IL6-Antagonisten wurde im nächsten Schritt in den von Baum et al. beschriebenen retroviralen Vektor pSF1N(Baum, C., Hegewisch-Becker, S., Eckert, H-G., Stocking, C., and Ostertag, W. 1995. Novel retroviral vectors for efficient expression of the multidrug resistance (mdr-1) gene in early hematopoietic cells. LT. Virol. 69: 7541—7547; Patentanmeldung PCT/EP95/03175) kloniert. Dieser Vektor ist ein MoLMV-Derivat und enthält regulatorische Elemente der Viren FUCF und MESV, die dazu führen, daß die mit diesem Vektor pSF1N transferierten Gene besonders stark in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen exprimiert werden. Dieser Vektor ist daher in Bezug auf Gentransfer in hämatopoetische Stammzellen bisherigen Vektoren überlegen und daher für einen möglichen gentherapeutischen Einsatz des IL6-Antagonisten in hämatopoetische Stammzellen besonders geeignet. Um den IL6-Antagonisten von endogenem IL6 unterscheiden zu können, wurde der Antagonist mit einem myc-Tag ausgestattet. Auf diese Art und Weise ist es leicht möglich, die IL6-Antagonisten-Expression im Serum oder Knochenmark des Patienten mittels immunologischer Methoden (z. B. ELISA) nachzuweisen. Das Neomycin-Resistenzgen im pSF1N wurde durch ein Puromycin-Resistenzgen ersetzt und über eine IRES Sequenz mit dem IL6-Antagonisten verbunden. Der neue durch den Einbau des IL6-Antagonisten resultierende Vektor wird pSF-IL-6AP bezeichnet.
- 3) Um den Vektor für eine mögliche therapeutische Anwendung am Menschen sicherer zu machen, wurde in einem weiteren Schritt ein Suizidgen, die Herpes simplex Thymidinkinase, in den Vektor eingebaut. Dies ermöglicht die Abtötung der durch den Vektor genmodifizierten Zelle im Patienten durch die systemische Gabe von Ganciclovir. Um die gleichzeitige Expression von IL6-Antagonist und Tk-Gen zu gewährleisten, wurden beide cDNAs im Vektor über eine IRES (Inter-Ribosomale-Erkennungsstelle) Sequenz verbunden. Auf diese Art und Weise liegen beide Gene auf derselben mRNA, werden also von demselben für Stammzellen besonders geeigneten Promotor in der Expression gesteuert, und werden dennoch getrennt translatiert. Somit könnten im Falle unvorhergesehener Nebenwirkungen des therapeutischen Gens z. B. auf die normale Hämatopoese des Patienten gezielt diejenigen Zellen abgetötet werden, die den IL6-Antagonisten produzieren. Der neue durch den Einbau des Tk-Suizidgens resultierende Vektor wird pSF-IL-6AT bezeichnet.
- 4) Um eine in vivo Selektion von Stammzellen erzielen zu können, wurde das Multidrug Resistenzgen (mdr-1) zusätzlich in den Vektor eingebaut. Auf diese Art und Weise können durch eine Chemotherapie, die im Rahmen der konventionellen Plasmozytomtherapie angewendet wird, diejenigen Stammzellen im Patienten angereichert werden, die auch den IL6-Antagonisten tragen. Dies würde zur Erhöhung der IL6-Antagonisten-Konzentration im Patienten führen und die therapeutische Wirksamkeit des Vektors erhöhen. Um die gleichzeitige Expression von IL6-Antagonist und mdr-1-Gen zu gewährleisten, wurden beide cDNAs im Vektor über eine IRES (Inter-Ribosomale-Erkennungsstelle) Sequenz verbunden. Auf diese Art und Weise liegen beide Gene auf derselben mRNA, werden also von demselben für Stammzellen besonders geeigneten Promotor in der Expression gesteuert, und werden dennoch getrennt translatiert. Somit werden Stammzellen, die unter dem Selektionsdruck einer Chemotherapie hohe Mengen an mdr-1 exprimieren auch gleichzeitig große Mengen IL6-Antagonist exprimieren. Der neue durch den Einbau des mdr-1-Gens resultierende Vektor wird pSF-IL-6AN bezeichnet.
- 5) Die Vektor-DNA wird mit Hilfe der retroviralen Verpackungszelllinien FLY13 und FLYRD18 zu Viren verpackt. Diese Verpackungslinien haben den Vorteil, daß sie wesentlich höhere (10—100fach) Virustiter erzeugen als bislang verwendete Linien (Cosset et al, Journ. Virol. 69: 7430—36, 1995). Dies führt zu einer Verbesserung der Gentransfereffizienz in hämatopoetische Stammzellen. Ein weiterer Vorteil dieser Linien besteht darin, daß sie virale Vektoren produzieren, die in humanem Serum stabil sind. Da bei einer klinischen Anwendung der Gentransfer in humanem Serum als Kultivierungsmedium durchgeführt werden muß, sind diese Verpackungslinien für diesen Zweck sehr gut geeignet. Beim Gentransfer in primäre hämatopoetische Stammzellen wird der virushaltige Überstand der Verpackungslinien verwendet. Die Stammzellen werden vorher 24 Stunden mit einem Zytokin-Cocktail (Brugger et al, Blood 81: 2579—84, 1993) behandelt. Danach wird der Virusüberstand dazugegeben und für 48 Stunden kultiviert. Dies führt zu einer Gentransfereffizienz von 10—20%.
- 6) Die Anwendung der Erfindung ist vor allem zur Behandlung des multiplen Myeloms vorgesehen. Da gezeigt wurde, daß das Zytokin IL6 ein essentieller Wachstumsfaktor für Plasmotytomzellen ist und der Entzug dieses Faktors zum Absterben der malignen Zellen führt, stellt die Expression hoher Konzentrationen des IL6-Antagonisten im Knochenmark mittels Gentransfer in Stammzellen einen kurativen Ansatz zur Behandlung des multiplen Myeloms dar und ist deshalb bisherigen Therapieverfahren potentiell überlegen.

Beispiel II

1. Die c-DNA des Sant 7 (= "Gen 2") (Lit. Sporeno et al, Blood, Vol. 87 (1996), S. 4510—4519) wurde, wie bereits im Beispiel I beschrieben, mit Hilfe einer RT-PCR mit mutagenen Primern konstruiert. Dadurch entstehen zusätzlich zu den im Beispiel I aufgeführten Änderungen folgende Aminosäure-Austausche:
 Pos. 57 (Aspartat für Leucin), Pos. 59 (Phenylalanin für Glutamat), Pos. 60 (Tryptophan für Asparagin). Pos. 75 (Tyrosin für Glutamin), Pos. 76 (Lysin für Serin)

Die Schritte 2—4 erfolgen analog Beispiel I.

5. Die Vektor-DNA wird mit Hilfe der retroviralen Verpackungslinie GP+envAm12 (Markowitz et al, Virology 167, 400—406, 1988) zu Viren verpackt. Diese Verpackungslinie hat den Vorteil, daß

— die Titer nicht wesentlich unter denen der Fly liegen

— die hier verwendete Virushülle besonders zur Infektion hämatopoetischer Stammzellen geeignet ist (Xu et al, Exp.-Hematology 22(2), Feb 223—30, 1994).

Die weitere Bearbeitung erfolgt gemäß Beispiel I.

Diese zusätzlichen 5 Mutationen im Interleukin 6 Molekül erhöhen die Wirksamkeit des IL6 Rezeptor-Antagonisten etwa um Faktor 60 (Sporeno et al.). Die nun verbesserte Antagonisten-Version kann nun analog Beispiel I in den oben aufgeführten Vektoren zum Einsatz kommen, wobei Position und Größe des IL-6 Rezeptorantagonisten innerhalb des Konstruktes unverändert bleiben.

Ein weiterer Vorteil der Anwendung des Sant 7 ist die Tatsache, daß für diese Variante zum jetzigen Kenntnisstand jede biologische Restaktivität am IL-6 Rezeptor ausgeschlossen werden kann, was für andere Ausführungen nicht gewährleistet sein muß.

Beispiel III

Die c-DNA der in Beispiel I und II eingesetzten IL-6-Antagonisten ("Gen 1" und "Gen 2") wurde in den retroviralen Vektor pLXSN, ebenfalls ein MoMLV-Derivat, kloniert. Dieser Vektor enthält außer dem viralen Vektor LTR noch einen weiteren internen Promoter (SV 40 oder CMV) für die unabhängige Transkription des Resistenzgens, in diesem Fall das Gen für die Neomycin-Resistenz. Diese bewährte Vektorkonstruktion erlaubt die in-vitro-Selektion infizierter Stammzellen mittels Neomycin oder Neomycin-Analoga und wurde schon mit Erfolg in mehreren Stammzell-Gentherapiestudien eingesetzt (z. B. Xu et al, Experimental Hematology 22: 223—230 (1994)), so daß die Funktion dieses Vektors im oben genannten System gesichert ist, auch wenn er nicht speziell für hohe transkriptionelle Aktivität in humanen hämatopoetischen Stammzellen ausgelegt ist.

Die Verpackung dieser retroviralen Vektoren erfolgt analog zu Beispiel I und II in den dort verwendeten Verpackungszelllinien, auch das Infektionsprotokoll ändert sich nicht (mit Ausnahme der Verwendung von Neomycin als Selektionsantibiotikum).

Patentansprüche

1. Retroviraler Vektor für den Gentransfer eines IL6-Antagonisten in humane hämatopoetische Stammzellen, bestehend aus

- einem retroviralen Ausgangsvektor,
- dem Gen eines IL6-Antagonisten,
- einem Suizid- bzw. Selektionsgen

— und ggf. Promotoren zur Transkription der Suizidbzw. Selektionsgene.

2. Vektor nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch ein MoMLV-Derivat als retroviralen Ausgangsvektor.

3. Vektor nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet durch den retroviralen Ausgangsvektor pSF1N.

4. Vektor nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet durch den retroviralen Ausgangsvektor pLXSN.

5. Vektor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen eines an bis zu 20 Kodons gegenüber dem humanen Interleukin-6 mutierten IL6-Antagonisten eingesetzt wird.

6. Vektor nach Anspruch 1 und 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen eines an 5—10 Kodons gegenüber dem humanen Interleukin-6 mutierten IL6-Antagonisten eingesetzt wird.

7. Vektor nach Anspruch 1, 5 und 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen des an 7 Kodons gegenüber dem humanen Interleukin-6 mutierten IL6-Antagonisten folgender Sequenz eingesetzt wird:

1 CCAGGCCC AGCTATGAAC TCCTTCTCCA GCGCCTT CGGTCCAGTT
 51 GCCTTCTCCC TGGGGCTGCT CCTGGTGTG CCTGCTGCCT TCCCTGCCCC 5
 101 AGTACCCCCA GGAGAAGATT CCAAAGATGT AGCCGCCCCA CACAGACAGC
 151 CACTCACCTC TTCAGAACGA ATTGACAAAC AAATTCGGgA CATCCTCGAC 10
 201 ttcATCTCAG CCCTGAGAAA GGAGACATGT AACAAGAGTA ACATGTGTGA
 251 AAGCAGCAAA GAGGCACTGG CAGAAAACAA CCTGAACCTT CCAAAGATGG 15
 301 CTGAAAAGA TGGATGCTTC CAATCTGGAT TCAATGAGGA GACTTGCCTG
 351 GTGAAAATCA TCACTGGTCT TTTGGAGTTT GAGGTATACC TAGAGTACCT 20
 401 CCAGAACAGA TTTGAGAGTA GTGAGGAACA AGCCAGAGCT GTGCAGATGA
 451 GaACAAAAGa CCTGATCCAG TTCCTGCAGA AAAAGGCCAAA GAATCTAGAT 25
 501 GCAATAACCA CCCCTGACCC AACCACAAAT GCCAGCCTGC TGACGAAGCT
 551 GCAGGCACAG AACCAGTGGC TGCAGGACAT GACAACTCAT CTCATTCTGC 30
 601 GCAGCTTTAA GGAGTTCCTG atccgCAGCC TGAGGCCTCT TCGGgcAATG
 651 TAGCATcGat ACC 35

(_k Gen 1^H)

8. Vektor nach Anspruch 1 und 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen eines an 12 Kodons gegenüber dem humanen Interleukin-6 mutierten IL6-Antagonisten (zusätzlich myc-Tag) eingesetzt wird:

1 CCAGGAtCCC AGCTATGAAC TCCTTCTCCA CAAGCGCCTT
 CGGTCCAGTT
 5 51 GCCTTCTCCC TGGGGCTGCT CCTGGTGTTG CCTGCTGCCT
 TCCCTGCCCC.
 10 101 AGTACCCCCA GGAGAAGATT CCAAAGATGT AGCCGCCCCA
 CACAGACAGC
 15 151 CACTCACCTC TTCAGAACGA ATTGACAAAC AAATTCGGgA
 CATCCTCGAC
 20 201 ttCATCTCAG CCCTGAGAAA GGAGACATGT AACAAGAGTA
 ACATGTGTGA
 25 251 AAGCAGCAAA GAGGCACTGG CAGAAAACAA CCTGAACCTT
 CCAAAGATGG
 30 301 CTGAAAAAGA TGGATGCTTC CAATCTGGAT TCAATGAGGA
 GACTTGCCTG
 35 351 GTGAAAATCA TCACTGGTCT TTTGGAGTTT GAGGTATACC
 TAGAGTACCT
 40 401 CCAGAACAGA TTTGAGAGTA GTGAGGAACA AGCCAGAGCT
 GTGCAGATGA
 45 451 GaACAAAAGa CCTGATCCAG TTCCTGCAGA AAAAGGCAAA
 GAATCTAGAT
 50 501 GCAATAACCA CCCCTGACCC AACCACAAAT GCCAGCCTGC
 TGACGAAGCT
 55 551 GCAGGCACAG AACCAGTGGC TGCAGGACAT GACAACATCAT
 CTCATTCTGC
 60 601 GCAGCTTTAA GGAGTTCCTG atccgCAGCC TGAGGGGCTCT
 TCGGgcAATG
 65 651 gaacagaaac tgatctccga agaagatctg taatagatcg atacc

(„Gen 2“)

9. Vektor nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch das Thymidinkinasegen als Suizidgen.
 10. Vektor nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch das Cytosin-Desaminasegen als Suizidgen.
 11. Vektor nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch das Puromycingen als Selektionsgen.
 12. Vektor nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch das *mdr-1*-Gen als Selektionsgen.
 13. Vektor nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch das Neomycin-Acetyltransferasegen als Selektionsgen.
 14. Vektor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die viralen immediate-early-Promotoren des humanen Zytomegalievirus (CMV) und Simian Virus 40 early Promotor (SV40) als interne Promotoren zur Transkription der Suizid- bzw. Resistenzgene in den Ausgangsvektoren eingesetzt werden.
 15. Vektor nach Anspruch 1 bis 3, 6, 7 und 9—13, gekennzeichnet durch
 — den retroviralen Ausgangsvektor pSF1N,
 — das Gen des an 7 Kodons gegenüber dem humanen Interleukin-6 mutierten IL6-Antagonisten der Sequenz "Gen 1"
 — und einem Suizid- bzw. Selektionsgen.
 16. Vektor nach Anspruch 1, 2, 4, 5, 8 und 14, gekennzeichnet durch
 — den retroviralen Ausgangsvektor pLXSN,
 — das Gen des an 12 Kodons gegenüber dem humanen Interleukin-6 mutierten IL 6-Antagonisten der Sequenz "Gen 2",
 — dem Gen für Neomycin-Acetyltransferase als Selektionsgen,
 — dem viralen Simian Virus 40 early Promotor (SV40) als interner Promotor zur Transkription des Selektionsgens im Ausgangsvektor.
 17. Vektor nach Anspruch 1—3, 5, 8 und 9—14, gekennzeichnet durch
 — den retroviralen Ausgangsvektor pSF1N,
 — das Gen eines an 12 Kodons gegenüber dem humanen Interleukin-6 mutierten IL6-Antagonisten der Sequenz "Gen 2",
 — und einem Suizid- bzw. Selektionsgen.

18. Vektor nach Anspruch 1—17, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen des IL6-Antagonisten und das Suizid- bzw. das Selektionsgen auf derselben mRNA, getrennt durch eine interribosomale Erkennungsstelle, angeordnet sind.

19. Verfahren zur Anwendung der Vektoren nach Anspruch 1—13, dadurch gekennzeichnet, daß hämatopoetische Stammzellen aus peripherem Blut bzw. Knochenmark von Patienten durch einen Zytokin-Cocktail stimuliert werden, der Transfer des Vektors in diese Stammzellen erfolgt und sie anschließend, bevorzugt durch intravenöse Injektion, wieder in den Patienten zurückgegeben werden. 5

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

10

15

20

25

30

35

40

45

50

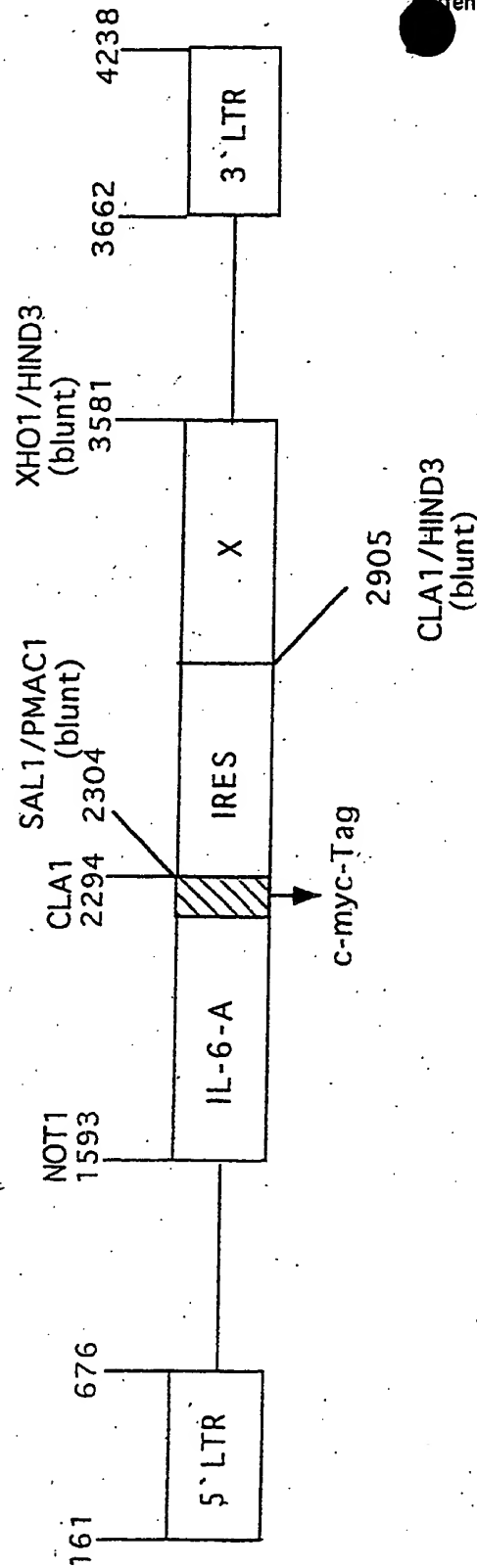
55

60

65

- Leerseite -

pSF-IL-6-AX

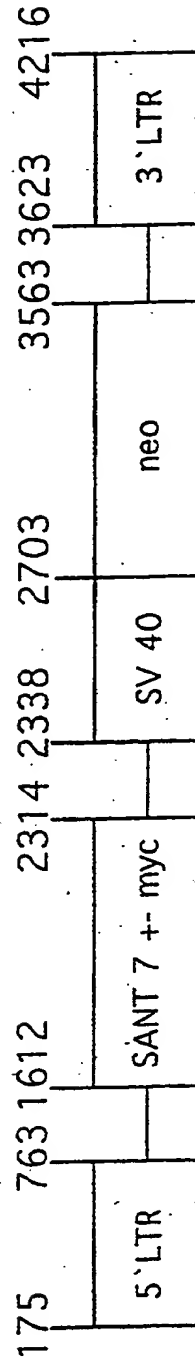


X: Suizidgen (Thymidinkinase, Cytosin-Desaminase) oder Selektionsgen (Puromycin, MDR-1)

Angaben über Restriktionsschnittstellen gelten für die Variante IL-6-A-P

Abbildung 1

pLXSN- SANT 7



SV 40: vorzugsweise SV 40 Promoter oder andere Promotoren

neo: Neomycin-Acetyltransferase oder andere der bekannten
Suizid- bzw. Resistenzgene in den Ausgangsvektoren pSF1N und
pLXSN

myc: myc-Tag

SANT 7: IL-6 Antagonist

Abbildung 2